11 月 November
2019，62(11)：1239 - 1249

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http：//www. insect. org. cn
doi：10. 16380/j. kcxb. 2019. 11. 001

家蚕幼虫-蛹变态期前胸腺和脂肪体细胞解离和程序性细胞死亡的比较分析

龙诗慧[1]，李 瑜[1]，田 铃[2]，李 胜[1]，李 康[1,*]

(1. 华南师范大学生命科学学院，广东省昆虫发育生物与应用技术重点实验室/昆虫科学与技术研究所，广州 510631；
2. 华南农业大学动物科学学院，广东省农业动物功能基因组学与分子育种重点实验室/广东省蚕桑工程技术研究中心，广州 510642)

摘要：【目的】检测家蚕 *Bombyx mori* 变态期前胸腺细胞的解离、自噬与凋亡，并与脂肪体的进行对比，从而解析昆虫幼虫-蛹变态期过程中不同组织重塑的异同。【方法】以家蚕5龄期、游走期、预蛹期和蛹期前胸腺和脂肪体组织为材料，在光学显微镜下观察前胸腺和脂肪体细胞解离情况；分别利用 Lyso-Tracker 和 TUNEL 染色，在荧光共聚焦显微镜下观察细胞自噬和细胞凋亡的发生情况；利用 qRT-PCR 检测家蚕前胸腺中自噬发生标志基因 *Atg*8 的表达水平；利用透射电镜观察前胸腺和脂肪体细胞自噬小体和前胸腺线粒体；利用 Caspase3 酶活性检测试剂盒测定 Caspase3 酶活性；利用 qRT-PCR 检测前胸腺中蜕皮酮(ecdysone)合成相关基因 *Spo*，*Phm*，*Dib* 和 *Sad* 的表达水平；利用酶免疫试验(enzyme-immunoassay，EIA)测定前胸腺中蜕皮酮的含量，进而检测合成蜕皮酮的活力。【结果】在家蚕幼虫到蛹的变态发育过程中，在化蛹第 1 天家蚕前胸腺和脂肪体细胞中同时开始出现细胞解离；脂肪体细胞自噬和凋亡分别在游走期和预蛹第 1 天开始出现并逐渐增强；而前胸腺一直到化蛹第 2 天都没有发生明显的细胞自噬和凋亡；此外，前胸腺中线粒体的形态变化和蜕皮酮合成相关基因的转录水平均与对应时期前胸腺合成蜕皮酮的活力一致。【结论】在变态发育时家蚕不同组织消亡发生的时间不同，虽然前胸腺和脂肪体在化蛹第 1 天同时出现细胞解离，但是前胸腺直到化蛹第 2 天都不发生细胞自噬和凋亡，可能与其持续合成蜕皮酮的功能有关。本研究为昆虫幼虫-蛹变态发育时期组织消亡的深入研究提供了理论依据与工作基础。

关键词：家蚕；前胸腺；脂肪体；细胞解离；自噬；凋亡；程序性细胞死亡

中图分类号：S881 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2019)11-1239-11

Comparative analysis of cell dissociation and programmed cell death in the prothoracic gland and fat body of *Bombyx mori* during the laval-pupal metamorphosis

LONG Shi-Hui[1], LI Yu[1], TIAN Ling[2], LI Sheng[1], LI Kang[1,*] (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Development Biology and Applied Technology/Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/Guangdong Provincial Sericulture and Mulberry Engineering Research Center, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Aim】To detect the cell dissociation, autophagy and apoptosis in the prothoracic gland of the silkworm, *Bombyx mori* during metamorphosis, and to compare tissue demise in the prothoracic gland

---

基金项目：国家自然科学基金项目(31702053)
作者简介：龙诗慧，女，1994 年 8 月生，广东湛江人，硕士研究生，研究方向为昆虫遗传与发育，E-mail：1582650808@qq. com
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：likang0118@foxmail. com
收稿日期 Received：2019-05-29；接受日期 Accepted：2019-08-26

with that in the fat body, so as to uncover the similarities and differences of tissue remodeling during the larval-pupal metamorphosis. 【Methods】With the prothoracic gland and fat body tissues of *B. mori* at the 5th instar, wandering, prepupal and pupal stages as the test materials, the cell dissociation in the prothoracic gland and fat body of *B. mori* was observed under light microscopy. The autophagy and apoptosis were observed after Lyso-Tracker and TUNEL staining, respectively, under fluorescence confocal microscopy. The expression profile of the autophagy marker gene *Atg*8 in the prothoracic gland was detected by qRT-PCR. The autophagosome in the prothoracic gland and fat body as well as the morphological changes of mitochondria in the prothoracic gland were observed under transmission electron microscopy. The Caspase3 activity was assayed using Capase3 enzyme assay kit. The expression profiles of Halloween genes *Spo*, *Phm*, *Dib* and *Sad* were detected by qRT-PCR. The ecdysone content in the prothoracic gland was detected by enzyme-immunoassay (EIA) aiming at furthermore determining the activity of the synthesis of ecdysone. 【Results】During the transition from larva to pupa of *B. mori*, both the prothoracic gland and fat body began to undergo cell dissociation on the 1st day of pupation. Autophagy and apoptosis in the fat body began to appear at the wandering stage and day 1 of prepupa, respectively, and gradually increased. However, autophagy and apoptosis did not occur in the prothoracic gland until the 2nd day after pupation. In addition, the morphological changes of mitochondria and the transcription levels of Halloween genes were consistent with the activity of ecdysone synthesis in the prothoracic gland at the corresponding developmental stage of *B. mori*. 【Conclusion】The time of tissue demise is different in different tissues of *B. mori* during metamorphosis. Cell dissociation appears on the 1st day after pupation in both the prothoracic gland and the fat body; however, autophagy and apoptosis in the prothoracic gland do not occur until the 2nd day after pupation, which may be related to its function in continuous synthesis of ecdysone. This study provides important scientific basis for the in-depth study of tissue demise during the larval-pupal metamorphosis in insects.

Key words: *Bombyx mori*; prothoracic gland; fat body; cell dissociation; autophagy; apoptosis; programmed cell death

组织重塑是一个动态的过程,存在于多种器官的不同发育阶段,该过程与衰老、病理和癌症等疾病的发生密切相关(de Souza *et al*., 2001; Untergasser *et al*., 2005; Hinz *et al*., 2012)。组织重塑也存在于完全变态昆虫中,其幼虫需要经过蛹期的发育才能变为成虫,这一虫态的出现包含了幼虫组织的消亡和成虫组织的形成。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 在幼虫到蛹的变态发育中,脂肪体重塑过程包括幼虫脂肪体细胞的解离(cell dissociation)、程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)以及新的成虫脂肪体的形成(Nelliot *et al*., 2006)。组织消亡是重塑的第一步,主要是通过细胞解离和 PCD 来完成的。果蝇脂肪体在化蛹 6 h 后开始出现细胞解离并逐渐增强;化蛹 14 h 后,脂肪体细胞彼此完全分离;最终脂肪体细胞会在蛹壳内重新结合形成成虫脂肪体(Nelliot *et al*., 2006; Zheng *et al*., 2016);家蚕脂肪体细胞解离在化蛹后 12 h 开始并逐渐增强(Jia *et al*., 2018)。PCD 主要包括细胞自噬(autophagy)和细胞凋亡(apoptosis)两种形式,其主要功能是响应上游信号以降解或移除长寿命蛋白、老旧或受损的细胞或细胞器等进行回收再利用以维持细胞的稳态,此外细胞自噬和凋亡也可以作为免疫反应响应外来病原的入侵等(Griffin, 2005; Orvedahl *et al*., 2010; Sir and Ou, 2010; Robinson *et al*., 2014)。

昆虫幼虫脂肪体的消亡主要受蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)信号调控(Bond *et al*., 2010)。20E 与 EcR 和 USP 组成的异源二聚体受体复合物结合后形成配体-受体复合物 20E-EcR-USP,通过与靶基因启动子上的 EcRE (20-hydroxyecdysone response element)结合,开始启动包括 Br-C, E74, E75 和 E93 等转录因子在内的初级应答基因表达;这些初级应答因子随后触发自噬相关基因(*Atg*)以及天冬氨酸凋亡酶编码基因 *Dronc* 和 *Drice*、死亡激活因子 *reaper* 和 *hid* 的表达,最终导致昆虫变态过程中细胞自噬和凋亡的发生(Yin and

Thummel, 2005; Hay and Guo, 2006; Spindler *et al*., 2009; 李康等, 2011）。ßFTZ-F1 是 20E 信号传导中的一个中晚期响应转录因子，对于 20E 信号介导的脂肪体消亡和重塑是必需的（Yamada *et al*., 2000; Bond *et al*., 2011）。在果蝇中，脂肪体特异过表达 *βFTZ-F1* 可以诱导基质金属蛋白酶 2（matrix metalloproteinase 2, MMP2）的过早表达导致脂肪体提前发生细胞解离。相反，MMP2 抑制因子 dBlimp-1 的过表达会导致化蛹的停止（Bond *et al*., 2011）。果蝇 MMP1 和 MMP2 均可被 20E 诱导并协同促进脂肪体的细胞解离，敲除 MMP1 或 MMP2 基因均可延缓脂肪体细胞的解离（Bond *et al*., 2010; Jia *et al*., 2014）。

昆虫脂肪体被认为相当于脊椎动物的脂肪组织和肝脏，是能量储存和代谢的中心，也是昆虫的重要免疫器官（Tian *et al*., 2013; Li *et al*., 2019）。前胸腺是昆虫幼虫合成 20E 前体蜕皮酮的主要器官，4 个 Halloween 基因 *Spook*（*Spo*），*Phantom*（*Phm*），*Disembodied*（*Dib*）和 *Shadow*（*Sad*）被证实参与蜕皮酮的合成，其合成水平受促前胸腺激素（PTTH）、胰岛素（IIS）和磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）等信号通路调控（Gilbert, 2004; Shingleton, 2005; Li *et al*., 2016）。家蚕 *Bombyx mori* 是鳞翅目昆虫的代表之一，目前对家蚕脂肪体组织消亡发生的研究已有重要进展。20E 主导和调控昆虫变态，在幼虫-蛹变态时期脂肪体的细胞解离和 PCD 过程中发挥重要的调控作用；但是蜕皮酮合成场所前胸腺的组织消亡变化进程尚无深入研究。据此，本研究以家蚕为对象，检测前胸腺细胞的解离、自噬与凋亡的发生，并与脂肪体的进行对比，解析昆虫幼虫-蛹变态期不同幼虫组织消亡的异同，为昆虫幼虫-蛹变态发育时期组织消亡的深入研究提供重要的依据和理论基础。

1　材料与方法

1.1　试虫与试剂

家蚕品种 P50 为广东省农业科学院蚕业研究所保存，在温度为 24～26℃、相对湿度 70%～80%、光周期 14L:10D 的条件下用新鲜桑叶饲喂（Li *et al*., 2016; Guo *et al*., 2018）。

主要试剂：Lyso-Tracker 染料（Thermo Fisher，美国），TUNEL 染料（碧云天，上海），Caspase3 活性检测试剂盒（碧云天，上海），蜕皮酮（Sigma-Aldrich，美国）。

1.2　家蚕前胸腺和脂肪体细胞形态学观察

同时解剖 1.1 节培养获得的 5 龄第 6 天（L5D6）、游走期（W）、预蛹第 1 天（PP1）、预蛹第 2 天（PP2）、化蛹第 1 天（P1）和化蛹第 2 天（P2）家蚕的前胸腺和脂肪体组织，快速用 0.1 mol/L PBS（pH 7.2）缓冲液清洗 1 遍，将清洗好的组织放于滴有 50% 甘油液的载玻片上，利用光学显微镜进行明场观测。

1.3　家蚕前胸腺和脂肪体细胞 Lyso-Tracker 和 TUNEL 染色

Lyso-Tracker 染色：解剖获得 5 龄第 6 天（L5D6）、游走期（W）、预蛹第 1 天（PP1）、预蛹第 2 天（PP2）、化蛹第 1 天（P1）和化蛹第 2 天（P2）家蚕前胸腺和脂肪体放入 1 mL 0.1 mol/L PBS 缓冲液中，加入 1 μL 37℃ 预温育的 Lyso-Tracker Red 工作液，37℃ 避光孵育 3～5 min 后用 0.1 mol/L PBS 缓冲液快速清洗 3 次，封片，利用荧光共聚焦显微镜（FV10-ASW, Olympus，日本）在同一荧光强度下分别观察和拍摄不同发育时期的家蚕前胸腺和脂肪体细胞自噬的发生情况。TUNEL 染色：解剖获得 5 龄第 6 天（L5D6）、游走期（W）、预蛹第 1 天（PP1）、预蛹第 2 天（PP2）、化蛹第 1 天（P1）和化蛹第 2 天（P2）家蚕前胸腺和脂肪体放入 1 mL 0.1 mol/L PBS 缓冲液中洗涤 1 次后放入 4% 的多聚甲醛中，在 4℃ 冰箱摇床上固定 1 h，将固定好的组织用 0.1 mol/L PBS 缓冲液在 4℃ 冰箱摇床上清洗 3 次，每次 10 min，然后将清洗好的组织放入适当体积的 5% Triton X-100 中于冰上打孔 30 min，用 0.1 mol/L PBS 缓冲液在 4℃ 冰箱摇床上清洗 3 次，每次 10 min，将清洗好的样品放在载玻片上，在样品上加 50 μL TUNEL 检测反应液并加入相应酶，37℃ 下避光孵育 60 min，用 0.1 mol/L PBS 缓冲液在 4℃ 冰箱摇床上清洗 3 次，每次 10 min，封片，利用荧光共聚焦显微镜（FV10-ASW, Olympus，日本）在同一荧光强度下分别观察和拍摄不同发育时期家蚕前胸腺和脂肪体细胞凋亡的发生情况。

1.4　qRT-PCR 检测家蚕前胸腺中自噬标志基因 *Atg8* 的表达变化

解剖获得 5 龄第 2－7 天（L5D2－7）、游走期（W）、预蛹第 1－2 天（PP1－2）和化蛹第 1－2 天（P1－2）家蚕幼虫的完整前胸腺各 10 对，3 组重复，采用 Trizol 抽提法（Invitrogen，美国）提取总 RNA，基本参照使用说明进行操作。抽提 RNA 后测定 A_{260} 和 A_{260}/A_{280} 用以计算 RNA 浓度（$40 \times A_{260} \times$ 稀

释倍数 μg/mL)和判断 RNA 纯度(A_{260}/A_{280} 应为 1.8~2.2)。对 RNA 使用 M-MLV(RNase H-)反转录酶(TaKaRa, 大连)进行 cDNA 第 1 链的合成,得到的 cDNA 溶液稀释 10 倍后用于 qRT-PCR 检测家蚕前胸腺中自噬基因 *Atg*8 的表达水平。qRT-PCR 引物如表 1 所示。qRT-PCR 反应体系(20 μL): SYBR-Green Mix(Bio-Rad, 美国)10 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, 稀释后的 cDNA 模板 2 μL, 灭菌水 6.4 μL。反应条件: 95℃预变性 2 min; 95℃变性 10 s, 58℃退火 10 s, 72℃延伸 15 s, 40 个循环; 95℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 从 55 – 95℃做产物溶解曲线。以家蚕 *rp*49 作为内参基因,计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列(5′–3′) Primer sequences
*rp*49	AB048205.1	S: CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC
		A: TGCTGGGCTCTTTCCACGA
*Atg*8	NM_001046779.1	S: AAGGCTAGGCTTGGAGAC
		A: CAGATGTGGGTGGAATGA
Spook (*Spo*)	NM_001111363.1	S: GGACATCCGATCCTTCATCT
		A: TCTTCGTGTAGCACCCTGAG
Phantom (*Phm*)	NM_001112751.2	S: GCCCTTTATACGCCATGTTT
		A: AGGCTTCTCTAAGCCCAACA
Disembodied (*Dib*)	NM_001043488.1	S: TGGGTAGTGAACATGCCAGT
		A: ATCTAAAGCTTCGGCGTCAT
Shadow (*Sad*)	NM_001112753.1	S: CGAGGAAGGGACTCCAGTAA
		A: AGTGTGGCAGATGGTACATGA

S: 上游引物 Sense primer; A: 下游引物 Anti-sense primer.

1.5 家蚕前胸腺和脂肪体细胞 Capase3 酶活性测定

解剖获得 5 龄第 6 天(L5D6)、游走期(W)、预蛹第 1 天(PP1)、预蛹第 2 天(PP2)、化蛹第 1 天(P1)和化蛹第 2 天(P2)家蚕的前胸腺各 10 对和脂肪体各 5 头,3 组重复,利用 RIPA 裂解液(碧云天,上海)裂解组织并离心获得总蛋白,随后用 Bradford 法测定蛋白浓度。参照 Capase3 酶活性测定试剂盒说明测定 pNA 标准曲线。同时配制 Caspase3 酶活性检测液,将上述反应体系置于 37℃孵育 1 h。在 A_{405} 处测定吸光度,通过与标准曲线对比,计算样品催化产生的 pNA 量从而得出每毫克蛋白中 Caspase3 的酶活性。

1.6 透射电镜观察家蚕前胸腺和脂肪体细胞中的自噬小体和前胸腺细胞中的线粒体

解剖获得 5 龄第 6 天(L5D6)、游走期(W)、预蛹第 2 天(PP2)和化蛹第 2 天(P2)家蚕前胸腺和脂肪体后迅速置于含有 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)固定液中固定 48 h,其中 24 h 后更换 1 次固定液;用 0.1 mol/L PBS (pH 7.2, 4℃)清洗戊二醛固定液,15 min/次,共 4 次;用 0.1 mol/L PBS(pH 7.2, 4℃)配制的 1% 锇酸 4℃后固定 2 h;用 0.1 mol/L PBS (pH 7.2, 4℃)洗锇酸,10 min/次,共 6 次,先后使用 30%, 50%, 70%, 80% 和 90% 乙醇脱水 1 次,各 15 min, 4℃下再用 100% 乙醇(加无水硫酸钠)脱水,15 min/次,共 3 次,然后使用环氧丙烷: EP812 = 3:1 (30 min), 1:1 (1 h) 和 1:3 (2 h) 进行过渡。最后用纯 EP812 4℃过夜后换新配制的纯 EP812,渗透 7 h。用纯 EP812 包埋样品 2 d 后置于 60℃烘箱,一周后切片并用雷诺兹柠檬酸铅染色,然后使用透射电镜(H7650, 日立)观察家蚕前胸腺和脂肪体细胞中的自噬小体和前胸腺细胞中的线粒体形态。

1.7 qRT-PCR 检测家蚕前胸腺中蜕皮酮合成相关基因的表达变化

将 1.4 节获得的 5 龄第 2 天至化蛹第 2 天家蚕前胸腺的 cDNA 模板,用于检测蜕皮酮合成相关基因(*Spo*, *Phm*, *Dib* 和 *Sad*)的表达水平,qRT-PCR 方

法同 1.4 节，引物如表 1 所示。

1.8 酶免疫试验（enzyme-immunoassay，EIA）测定家蚕前胸腺中蜕皮酮含量

在超净工作台上取 1.2 节获得 5 龄第 6 天（L5D6）、游走期（W）、预蛹第 2 天（PP2）和化蛹第 2 天（P2）家蚕完整前胸腺各 10 对，3 组重复，放入添加抗生素的 Grace 培养基中进行组织离体培养，27℃预培养 1 h 后用镊子取出放入新的添加抗生素的 Grace 培养基中 27℃培养 24 h，去除前胸腺并收取培养基，参照叶滨等（2016）利用 EIA 测定蜕皮酮含量，以培养基中蜕皮酮的含量作为对前胸腺蜕皮酮合成活力的检测。

1.9 数据分析

利用 $2^{-\Delta C_T}$ 法计算不同发育时期基因的相对表达量；利用平均值 ± 标准差（mean ± *SD*）计算 3 组重复的误差；利用单因素方差分析（one-way ANOVA）计算数据的显著性差异。

2 结果

2.1 家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺和脂肪体细胞解离的形态学观察

解剖 5 龄第 6 天至化蛹第 2 天家蚕前胸腺和脂肪体进行白光明场下观察细胞的解离。结果如图 1 所示，从 5 龄摄食期到预蛹第 2 天，不管是前胸腺（图 1：A）还是脂肪体（图 1：B），其细胞均呈现致密的排列，没有出现解离的现象；直到化蛹后第 1 天，两个组织的细胞开始排列疏松并且细胞间隙增加，化蛹第 2 天细胞解离现象较为明显。这些结果表明，从幼虫到蛹的变态期，家蚕的前胸腺和脂肪体均在化蛹后第 1 天开始发生细胞解离。

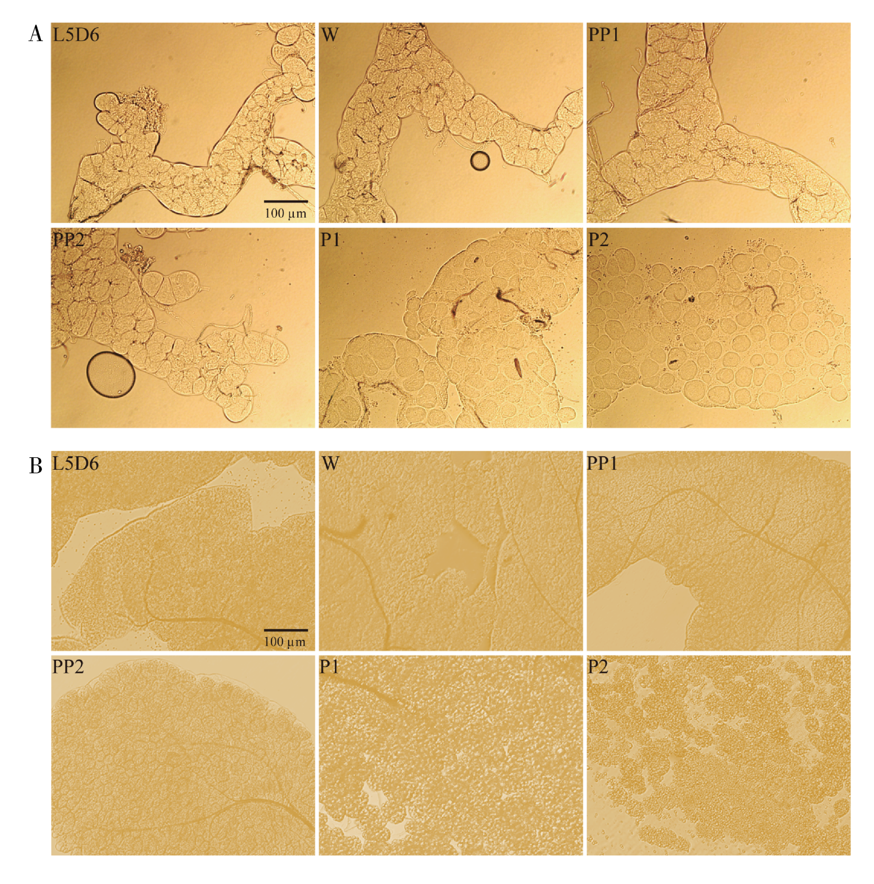


图 1　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺（A）和脂肪体（B）细胞解离的发育变化

Fig. 1　Developmental profiles of cell dissociation in prothoracic gland (A) and fat body (B) of *Bombyx mori* during the larval-pupal metamorphosis

L5D6：5 龄第 6 天 Day 6 of the 5th instar；W：游走期 Wandering stage；PP1 -2：分别为预蛹第 1 天和第 2 天 Day 1 and 2 of prepupa，respectively；P1 -2：分别为蛹期第 1 天和第 2 天 Day 1 and 2 of pupa，respectively.

2.2 家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺和脂肪体细胞自噬发生的比较

结果如图 2 所示，Lyso-Tracker 染色显示从家蚕 5 龄第 6 天一直到化蛹第 2 天，前胸腺细胞的细胞质中一直没有酸性溶酶体出现（图 2：A），而脂肪体在游走期就开始出现酸性溶酶体并且数量逐渐增多

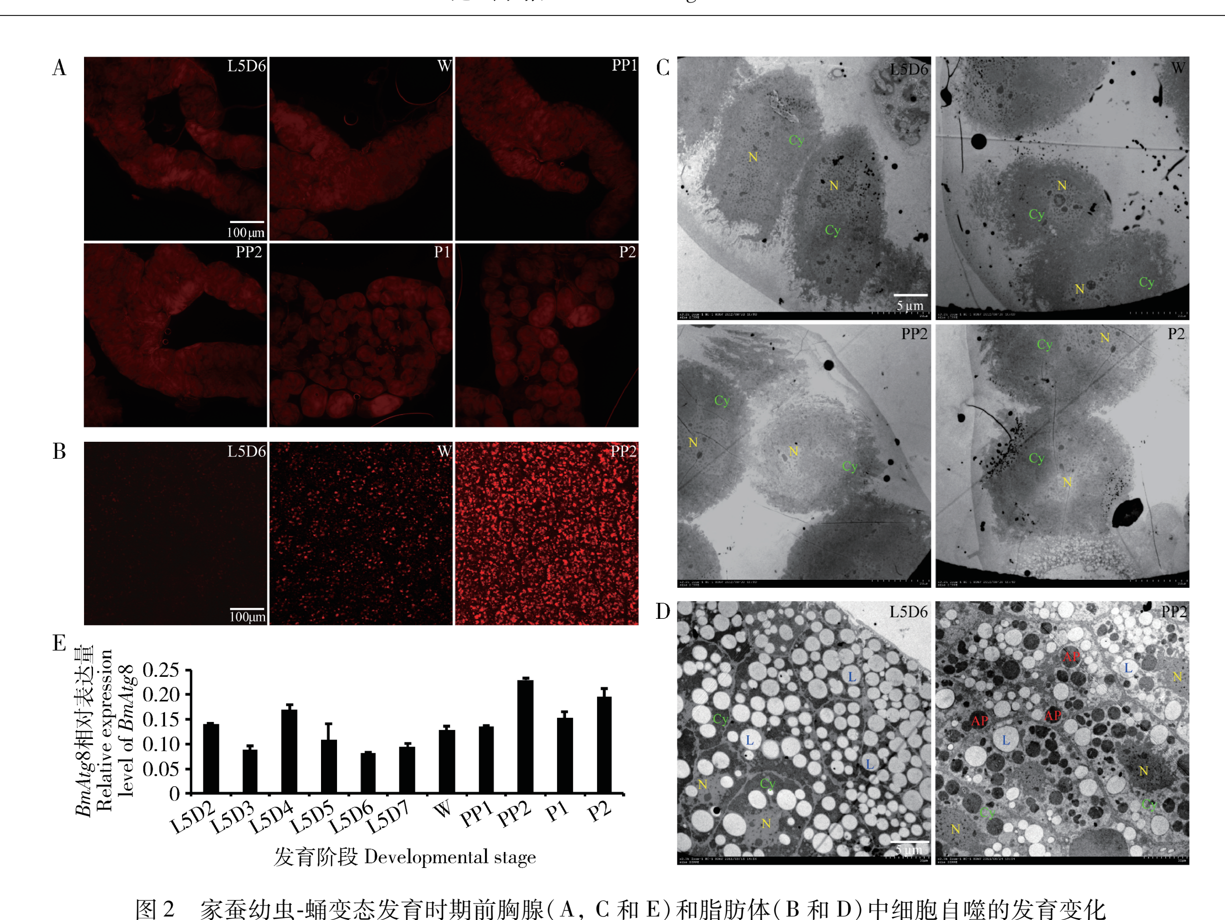


图 2　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺(A, C 和 E)和脂肪体(B 和 D)中细胞自噬的发育变化

Fig. 2　Developmental profiles of autophagy in prothoracic gland (A, C and E) and fat body (B and D) of *Bombyx mori* during the larval-pupal metamorphosis

A, B: Lyso-Tracker 染色后荧光共聚焦显微镜观察 Observation under fluorescence confocal microscopy after Lyso-Tracker staining; C, D: 透射电镜观察细胞中的自噬小体 Autophagosomes in cells under transmission electron microscopy; E: qRT-PCR 检测前胸腺中 *BmAtg8* 的转录水平 mRNA level of *BmAtg8* in prothoracic gland detected by qRT-PCR. N: 细胞核 Nucleus; Cy: 细胞质 Cytoplasm; L: 脂滴 Lipid droplet; AP: 自噬小体 Autophagosome; L5D2 -7: 分别为 5 龄第 2 -7 天 Day 2 -7 of the 5th instar, respectively; W: 游走期 Wandering stage; PP1 -2: 分别为预蛹第 1 天和第 2 天 Day 1 and 2 of prepupa, respectively; P1 -2: 分别为蛹期第 1 天和第 2 天 Day 1 and 2 of pupa, respectively. 下图同 The same for the following figures. 图中数据为 3 组重复的平均值 ± 标准差。Data in the figure are mean ± *SD* of three replicates.

(图 2: B)。与 Lyso-Tracker 染色结果一致,在 5 龄第 6 天、游走期、预蛹第 2 天和化蛹第 2 天 4 个时期,前胸腺细胞的透射电镜观察也均没有检测到自噬小体的存在(图 2: C);而在脂肪体中,与 5 龄第 6 天相比,预蛹第 2 天的细胞质中出现大量的自噬小体(图 2: D)。*Atg*8 是自噬发生的标志基因(张淑尧等, 2019),虽然 qRT-PCR 结果显示前胸腺中 *Atg*8 的转录水平在预蛹第 2 天有轻微增加(图 2: E),但是与之前脂肪体中检测到的 *Atg*8 增加趋势(Tian *et al*., 2013)相差甚远。以上结果表明,从幼虫到蛹的变态发育过程中,家蚕脂肪体细胞发生剧烈的自噬,而前胸腺直到化蛹后第 2 天也没有出现细胞自噬。

2.3　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺和脂肪体中细胞凋亡发生的比较

结果如图 3 所示,从 5 龄第 6 天开始至化蛹第 2 天,前胸腺中一直没有 TUNEL 染色显示的细胞凋亡发生(图 3: A),而脂肪体在预蛹第 1 天开始出现细胞凋亡并逐渐增强(图 3: B)。与 TUNEL 染色结果一致,前胸腺中的 Caspase3 活性一直到化蛹第 2 天均基本保持不变(图 3: C);而脂肪体中的 Caspase3 活性在预蛹第 1 天开始明显增加并呈现显著上升的趋势($P<0.05$)(图 3: D)。以上结果表明,在幼虫到蛹的变态过程中,家蚕脂肪体细胞在预蛹期开始发生细胞凋亡,而前胸腺直到化蛹第 2 天也没有出现细胞凋亡的现象。

2.4　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺细胞中线粒体形态学的观察

昆虫幼虫主要在前胸腺中合成 20E 的前体 E,而其线粒体是合成 E 的中心。透射电镜观察结果显示,在 5 龄第 6 天家蚕前胸腺中线粒体呈现致密

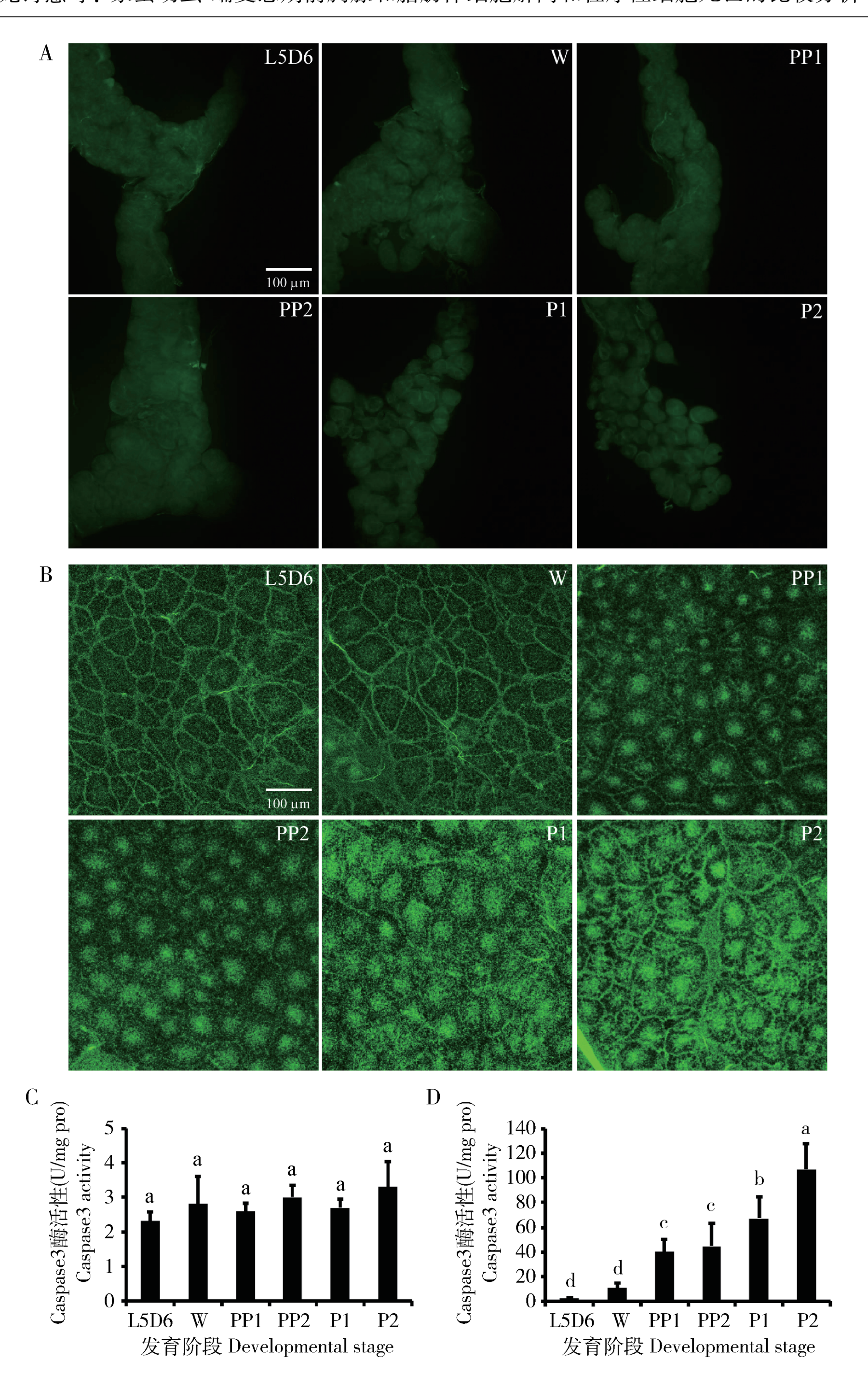


图 3　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺(A 和 C)和脂肪体(B 和 D)中细胞凋亡的发育变化

Fig. 3　Developmental profiles of apoptosis in prothoracic gland (A and C) and fat body (B and D) of *Bombyx mori* during the larval-pupal metamorphosis

A, B：TUNEL 染色后荧光共聚焦显微镜观察 Observation under fluorescence confocal microscopy after TUNEL staining；C, D：Caspase3 酶活性检测 Caspase3 activity assay. C 和 D 图中数据为 3 组重复的平均值 ± 标准差；柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$，单因素方差分析)。Data in the figure are mean ± *SD* of three replicates in C and D, and different letters above bars mean significant difference ($P<0.05$, one-way ANOVA).

而且体积较小的状态(图 4：A)；而在游走期线粒体体积变大并且可以看到明显的空腔(图 4：B)，在预蛹第 2 天线粒体体积进一步增大(图 4：C)，内嵴清晰可见；随后在化蛹第 2 天，线粒体体积减小并恢复到游走期水平(图 4：D)。

2.5　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺中蜕皮酮合成相关基因的表达变化

qRT-PCR 结果显示，*Spo*(图 5：A)，*Phm*(图 5：B)和 *Dib*(图 5：C)的转录水平在游走前期和预蛹期达到峰值，而最后一步合成蜕皮酮的基因 *Sad* 的

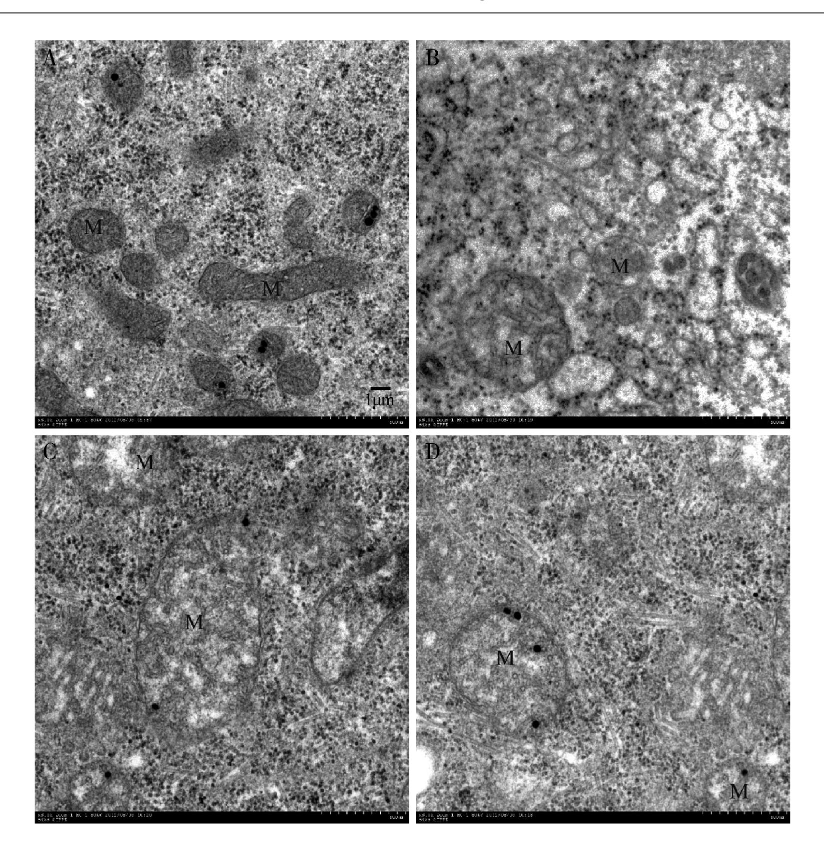


图 4 家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺细胞中线粒体形态学透射电镜观察

Fig. 4 Morphological observation of mitochondria in the prothoracic gland cell of *Bombyx mori* during the larval-pupal metamorphosis by transmission electron microscope

A: 5 龄第 6 天 Day 6 of the 5th instar; B: 游走期 Wandering stage; C: 预蛹第 2 天 Day 2 of prepupa; D: 化蛹第 2 天 Day 2 of pupa. M: 线粒体 Mitochondria.

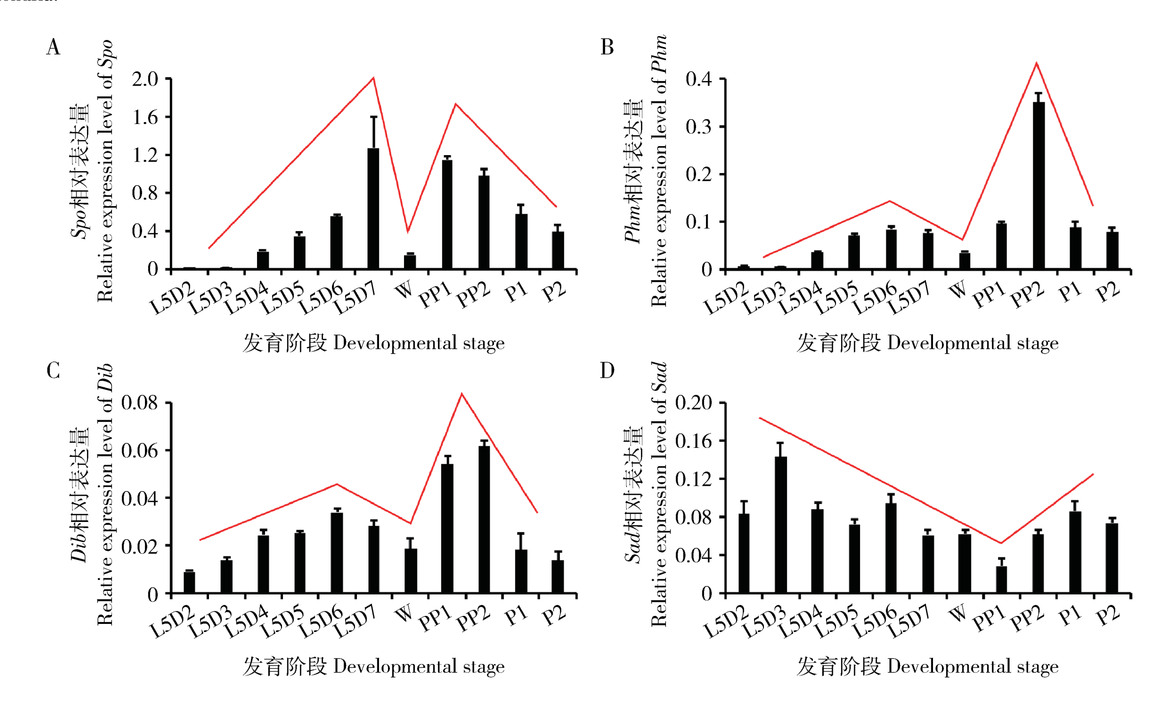


图 5 家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺中蜕皮酮合成相关基因的表达谱

Fig. 5 Expression patterns of genes related to biosynthesis of ecdysone in the prothoracic gland of *Bombyx mori* during the larval-pupal metamorphosis

A: *Spo*; B: *Phm*; C: *Dib*; D: *Sad*. 图中数据为 3 组重复的平均值 ± 标准差。Data in the figure are mean ± *SD* of three replicates.

转录变化趋势与前三者相反(图 5：D)，其表达量在 20E 滴度峰值的时期反而最低。

2.6　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺中蜕皮酮的合成活力

以培养基中蜕皮酮的含量作为对前胸腺蜕皮酮合成活力的检测。EIA 结果显示，相对于 5 龄第 6 天摄食期，游走期前胸腺中蜕皮酮的合成开始增加，并在预蛹第 2 天蜕皮酮含量达到峰值(图 6)。

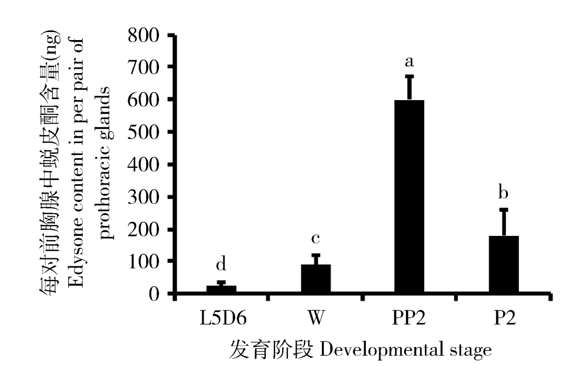


图 6　家蚕幼虫-蛹变态发育时期前胸腺中蜕皮酮含量的变化

Fig. 6　Changes in ecdysone content in the prothoracic gland of *Bombyx mori* during the larval-pupal metamorphosis

图中数据为 3 组重复的平均值 ± 标准差，柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$，单因素方差分析)。Data in the figure are mean ± *SD* of three replicates. Different letters above bars mean significant difference ($P<0.05$, one-way ANOVA).

3　讨论

我们的结果显示，家蚕脂肪体的细胞解离在化蛹后第 1 天才开始(图 1：B)，明显晚于游走期的自噬(图 2：B 和 D)和预蛹期的凋亡(图 3：B 和 D)发生，这与家蚕脂肪体细胞解离在化蛹 12 h 后开始和果蝇脂肪体在化蛹 6 h 后开始(Nelliot *et al*., 2006；Jia *et al*., 2018)是吻合的。昆虫前胸腺细胞解离的开始时间尚无报道，我们的结果显示家蚕前胸腺细胞也是在化蛹第 1 天开始解离(图 1：A)，说明两个组织发生消亡时至少在家蚕中细胞解离是同时开始的。在果蝇脂肪体中，20E 中晚期应答因子 ßFTZ-F1 对于诱导 MMP 的表达是必需的(Bond *et al*., 2011)；我们在家蚕脂肪体中的研究发现，20E 可以诱导 *BmMmp* 基因的表达(Guo *et al*., 2018)，暗示 20E 信号对细胞解离的调控在家蚕和果蝇脂肪体中是一致的。

细胞自噬和凋亡是昆虫变态发育组织消亡过程中发生的重要生理事件。我们在家蚕脂肪体中的检测发现自噬发生(游走期)早于凋亡发生(预蛹第 1 天)1 d(图 2 和 3)，这与变态期家蚕中肠组织重塑中自噬先于凋亡的发生(Franzetti *et al*., 2012)吻合，说明细胞自噬与凋亡发生的先后顺序在围周组织中具有一致性。前胸腺是昆虫幼虫合成蜕皮酮的特异组织，蛹中后期发生消亡，成虫没有前胸腺，然而我们的数据显示在脂肪体发生消亡的时候(图 2：B 和 D；图 3：B 和 D)，前胸腺并没有发生细胞自噬和凋亡，暗示了前胸腺的消亡可能存在除细胞凋亡与自噬之外的特殊机制，值得我们深入解析。

幼虫期前胸腺是 20E 前体蜕皮酮合成的主要场所，其细胞结构可分为 3 个时期，即：(1) 不活动期：细胞核呈圆形，核内密布染色质及核仁，细胞质内有结构完整的线拉体、粗面及滑面内质网、核糖体和高尔基氏体，细胞外围的细胞间区内有许多小囊泡及多泡囊；(2) 活动期：细胞结构变化为细胞核膜出现内陷、外凸，形成波浪形的核周膜；线粒休变形，出现内峭稀疏的空心线粒体；(3) 激素释放期：细胞核变形，形成若干长短不一向外伸出的指状突，有些伸达细胞边缘；其余细胞器退化，其后仅余残缺的高尔基氏体和稀疏的核糖体；线粒体的内峭逐渐消失，成为空腔扩大的及空腔内藏“膜轮”的线粒体(Gersch and Birkenbeil, 1979；Benedeczky *et al*., 1980)。我们的数据显示：第一，虽然透射电镜显示家蚕前胸腺从 5 龄第 6 天到化蛹第 2 天都没有检测到细胞自噬和凋亡(图 2：A，C 和 E；图 3：A 和 C)，但是其线粒体在 PP2 时期体积最大而且空腔扩大(图 4)，即处于蜕皮酮合成和释放的活跃期，而且该形态学变化与同时期血淋巴中 20E 的滴度变化(Li *et al*., 2015)吻合；第二，透射电镜显示的线粒体形态变化与前胸腺中蜕皮酮合成相关基因(*Spo*，*Phm* 和 *Dib*)的表达趋势吻合(图 5：A–C)，而最后一步合成蜕皮酮基因 *Sad* 的变化趋势与前 3 者相反(图 5：D)，该结果与烟草天蛾 *Manduca sexta* 中 *Sad* 基因的表达趋势(Rewitz *et al*., 2006)一致，推测 *Sad* 是线粒体中蜕皮酮合成的一个限速酶；第三，透射电镜显示的线粒体形态变化与相应时期离体培养的前胸腺细胞中蜕皮酮的合成活力(图 6)相吻合。以上结果说明直到化蛹第 2 天家蚕前胸腺不发生自噬和凋亡的可能原因是为了持续合成幼虫变态所需的大量 20E 前体蜕皮酮，但详细调控机制尚不清楚。

通过对家蚕前胸腺和脂肪体组织细胞消亡事件

的比较分析，本研究初步了解了不同幼虫组织在幼虫-蛹变态发育过程中其细胞解离、自噬和凋亡的发生时间顺序，而细胞自噬和凋亡发生的早晚可能取决于不同组织的功能差异，为今后探究组织重塑调控的分子机理奠定了工作基础。

参考文献（References）

Benedeczky I, Malá J, Sehnal F, 1980. Ultrastructural study on the innervation of prothoracic glands in *Galleria mellonella*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41(3): 400–407.

Bond ND, Hoshizaki DK, Gibbs AG, 2010. The role of 20-hydroxyecdysone signaling in *Drosophila* pupal metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 157(4): 398–404.

Bond ND, Nelliot A, Bernardo MK, Ayerh MA, Gorski KA, Hoshizaki DK, Woodard CT, 2011. βFTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 360(2): 286–296.

de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF, 2001. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 50(8): 1863–1871.

Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, Xie K, Deng XJ, Li JP, Li QR, Yang WY, Zeng WN, Casartelli M, Deng HM, Cappellozza S, Grimaldi A, Xia Q, Tettamanti G, Cao Y, Feng Q, 2012. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, 17(3): 305–324.

Gersch M, Birkenbeil H, 1979. The ultrastructure of a hitherto unrecognized gland, the cephalic gland in the head of *Orconectes limosus* which produces ecdysteroids. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 39(4): 498–504.

Gilbert LI, 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 215(1–2): 1–10.

Griffin DE, 2005. Neuronal cell death in alphavirus encephalomyelitis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 289: 57–77.

Guo SY, Wu WM, Li SY, Liu Y, Ruan ZF, Ye MQ, Xiao Y, Zhong YJ, Cao Y, Li K, Tian L, 2018. 20-Hydroxyecdysone-upregulated proteases involved in *Bombyx* larval fat body destruction. *Insect Mol. Biol.*, 27(6): 724–738.

Hay BA, Guo M, 2006. Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22: 623–650.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbian G, 2012. Recent developments in myofibroblast biology-paradigms for connective tissue remodeling. *Am. J. Pathol.*, 180(4): 1340–1355.

Jia QQ, Chen XX, Wu LX, Ruan ZF, Li K, Li S, 2018. Matrix metalloproteinases promote fat body cell dissociation and ovary development in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 111: 8–15.

Jia QQ, Liu Y, Liu HH, Li S, 2014. Mmp1 and Mmp2 cooperatively induce *Drosophila* fat body cell dissociation with distinct roles. *Sci. Rep.*, 4: 7535.

Li K, Guo EE, Hossain MS, Li QR, Cao Y, Tian L, Deng XJ, Li S, 2015. *Bombyx* E75 isoforms display stage- and tissue-specific responses to 20-hydroxyecdysone. *Sci. Rep.*, 5: 12114.

Li K, Li S, Cao Y, 2011. Transcriptional regulation by 20-hydroxyecydsone and its nuclear receptor EcR-USP. *Acta Entomol. Sin.*, 54(8): 933–937. [李康, 李胜, 曹阳, 2011. 蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制. 昆虫学报, 54(8): 933–937]

Li K, Tian L, Guo ZJ, Guo SY, Zhang JZ, Gu SH, Palli SR, Cao Y, Li S, 2016. 20-Hydroxyecdysone (20E) primary response gene *E75* isoforms mediate steroidogenesis autoregulation and regulate developmental timing in *Bombyx*. *J. Biol. Chem.*, 291(35): 18163–18175.

Li S, Yu XQ, Feng QL, 2019. Fat body biology in the last decade. *Annu. Rev. Entomol.*, 64: 315–333.

Nelliot A, Bond N, Hoshizaki DK, 2006. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*, 44(8): 396–400.

Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, Tallóczy Z, Zou Z, Levine B, 2010. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe*, 7(2): 115–127.

Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI, 2006. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(Pt 6): 1256–1260.

Robinson SM, Tsueng G, Sin J, Mangale V, Rahawi S, McIntyre LL, Williams W, Kha N, Cruz C, Hancock BM, Nguyen DP, Sayen M, Hilton B, Doran KS, Segall A, Wolkowicz R, Cornell CT, Whitton J, Gottlieb RA, Feuer R, 2014. Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.*, 10(4): e1004045.

Shingleton AW, 2005. Body-size regulation: combining genetics and physiology. *Curr. Biol.*, 15(20): 825–827.

Sir D, Ou JJ, 2010. Autophagy in viral replication and pathogenesis. *Mol. Cells*, 29(1): 1–7.

Spindler KD, Hönl C, Tremmel C, Braun S, Ruff H, Spindler-Barth M, 2009. Ecdysteroid hormone action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(24): 3837–3850.

Tian L, Ma L, Guo EE, Deng XJ, Ma SY, Xia QY, Cao Y, Li S, 2013. 20-Hydroxyecdysone upregulates *Atg* genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 9(8): 1172–1187.

Untergasser G, Madersbacher S, Berger P, 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol.*, 40(3): 121–128.

Yamada M, Murata T, Hirose S, Lavorgna G, Suzuki E, Ueda H, 2000. Temporally restricted expression of transcription factor beta FTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 127(23): 5083–5092.

Ye B, Li K, Li S, Li K, 2016. Detection of ecdysteroids in insect hemolymph by a combination of reverse-phase high-performance lipid chromatography and an enzyme linked immunosorbent assay. *Chin.*

J. Appl. Entomol., 53(2): 420 – 425. [叶滨, 李康, 李胜, 李凯, 2016. 结合反相高效液相色谱和酶联免疫吸附法测定昆虫血淋巴中的蜕皮甾醇激素. 应用昆虫学报, 53(2): 420 – 425]

Yin VP, Thummel CS, 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16(2): 237 – 243.

Zhang SY, Dai YC, Wu KZ, Li SY, Cao Y, Deng XJ, Tian L, 2019. Regulation of ATG8 subcellular localization and nuclear shrinkage by 20-hydroxyecdysone in the fat body of *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 62(5): 527 – 534. [张淑尧, 戴易晨, 吴坤钟, 李暑燕, 曹阳, 邓小娟, 田铃, 2019. 蜕皮激素对家蚕脂肪体中 BmmATG8 蛋白亚细胞定位与细胞核皱缩的调控. 昆虫学报, 62(5): 527 – 534]

Zheng H, Yang X, Xi Y, 2016. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sci.*, 167: 22 – 31.

(责任编辑：马丽萍)